

На правах рукописи

Козин Виталий Владиславович

РАННИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ СОБЫТИЯ
ФОРМИРОВАНИЯ МЕЗОДЕРМЫ У НЕРЕИДНЫХ ПОЛИХЕТ

03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» на кафедре эмбриологии

Научный руководитель: **Костюченко Роман Петрович**
кандидат биологических наук, доцент,
и.о. заведующего кафедрой эмбриологии, ФГБОУ
ВО Санкт-Петербургский государственный
университет

Официальные оппоненты: **Воронежская Елена Евгеньевна**
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории нейробиологии развития,
ФГБУН Институт биологии развития имени
Н.К. Кольцова РАН

Зайцева Ольга Викторовна
доктор биологических наук, доцент, заведующая
лабораторией эволюционной морфологии,
ФГБУН Зоологический институт РАН

Ведущая организация: ФГБОУ ВО Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова

Защита состоится «___» _____ 2017 г. в ___ часов на заседании
диссертационного совета Д.212.232.12 при Санкт-Петербургском
государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербургский государственный университет.
С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. М.Горького
Санкт-Петербургского государственного университета и на сайте СПбГУ:
<https://disser.spbu.ru/files/disser2/disser/ZvVpHX1b9c.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д.212.232.12,
доктор биологических наук

Л.А. Мамон

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Сегрегация зародышевых листков и спецификация клеточных линий являются одним из фундаментальных свойств многоклеточных животных. Эти события раннего развития во многом определяют и будущий план строения в целом и его более мелкие детали. Богатейший материал эмбриологических описаний на протяжении столетий служил доказательной базой для эволюционных построений. Поиск конкретных механизмов развития, начатый эмбриологами-экспериментаторами, во многом обеспечил прогресс молекулярной и клеточной биологии прошлого века. Сегодня достижения молекулярно-генетической отрасли биологии делают возможным по-новому взглянуть на феномены индивидуального и исторического развития живых организмов. Стало возможным и чрезвычайно востребованным всестороннее изучение не только ограниченного числа модельных объектов, но и тех групп, в развитии которых существуют уникальные, а зачастую и парадоксальные закономерности.

К группе *Spiralia* в эмбриологическом понимании относят аннелид, моллюсков, немертин и плоских червей. В основном все они характеризуются стереотипным паттерном дробления с ранней сегрегацией зародышевых листков и клеточных линий, что внешне проявляется телобластическим способом формирования различных зачатков, в том числе и мезодермы. Потрясающий консерватизм развития спиралий состоит в гомологии расположения и судьбы многих бластомеров у зародышей дальнеродственных животных. Вместе с тем, на более поздних стадиях развития в ряду *Spiralia* наблюдается большое разнообразие, от паренхиматозных планарий с ресничной локомоцией до раковинных моллюсков, обладающих поперечнополосатыми мышцами. Даже в пределах типа *Annelida* развитие может включать стадию свободноживущей личинки трохофоры, превращающейся в процессе метаморфоза в ювенильного червя (как это происходит у "*Polychaeta*") или быть прямым, когда из яйцевых оболочек вылупляется молодой червь, а не личинка (как у олигохет и пиявок – представителей *Clitellata*). Как объяснить это противоречивое сочетание внешне единообразного высоко детерминативного эмбриогенеза и разительно отличающихся взрослых форм? Решать этот актуальнейший вопрос следует не только на морфологическом и клеточном уровне, но и с привлечением современных молекулярно-генетических и функциональных методов анализа развития.

Spiralia (в современной макрофилогении – синоним клады *Lophotrochozoa*) являются крупнейшей, но до сих пор скудно изученной в генетическом аспекте ветвью *Bilateria*. Важнейшим эволюционным приобретением раннего развития трехслойных (= *Bilateria*) было обособление отдельного мезодермального листка. Молекулярной основой этой инновации считают вычленение миогенных факторов из общей мезэнтодермальной программы, приобретение ими самостоятельности и самодостаточности с последующей дивергенцией сложившейся мезодермальной генной регуляторной сети (Martindale, 2005; Козин, Костюченко, 2016). Как эволюционно более молодой, мезодермальный листок имеет наибольшую вариабельность в механизмах своего формирования в разных филогенетических линиях. Популярно мнение о том, что появление мезодермы в эмбриогенезе *Bilateria*

во многом обеспечило взрывообразный рост числа планов строения тела в раннем кембрии (Martindale et al., 2004; Burton, 2008). Вместе с тем, такие принципиальные вопросы, как клеточные и молекулярные механизмы формирования мезодермы в эмбриогенезе и постларвальном развитии (при метаморфозе и регенерации) многих животных, пока не нашли решения. Тем важнее становится комплексное сравнительное изучение развития именно мезодермы, что должно приблизить к пониманию путей эволюции и создания современного биоразнообразия.

Клеткой-родоначальницей туловищной мезодермы (энтomezодермы) большинства спиралий является вторая соматобласт – 4d. В результате равного деления 4d образуются два мезотелобласта, при пролиферации которых появляются билатерально-симметричные мезодермальные полосы (МП). В основном, представления о характере пролиферации и формообразования энтomezодермы спиралий основываются на описаниях небольшого числа объектов с экстраполяцией на всю группу, что нельзя признать обоснованным в современных реалиях. В последние годы, с целью определения степени эволюционного консерватизма развития мезодермы, были детально изучены клеточные линии энтomezодермы у некоторых аннелид (*Helobdella*, *Tubifex*, *Capitella*, *Platynereis*) и моллюсков (*Ilyanassa*, *Crepidula*) (Rabinowitz et al., 2008; Meyer et al., 2010; Gline et al., 2011; Lyons et al., 2012; Fischer, Arendt, 2013). Эти работы сделали еще более явными различия в раннем развитии мезодермы данных видов. Оказалось, что классические представления, изложенные в учебных руководствах, несводимы и неприложимы к большинству известных к сегодняшнему дню паттернов развития.

Кроме выяснения судьбы клеточных клонов и картирования зародышей *Spiralia*, в настоящий момент первостепенной задачей является идентификация конкретных участников программ развития, обеспечивающих спецификацию и последующее паттернирование зародышевых листков. Благодаря ряду разрозненных исследований, в производных энтomezодермы – МП трохофоры – у моллюсков *Haliotis* и *Ilyanassa* была обнаружена дифференциальная экспрессия генов *Mox*, *Nanos*, *Vasa*, *PL10* (Hinman, Degnan, 2002; Rabinowitz et al., 2008; Kranz et al., 2010), у полихеты *Capitella* – гомологов *Twist*, *Hairy*, *Evx*, *Runx* (Dill et al., 2007; Thamm, Seaver, 2008; Seaver et al., 2012), равно как *Nanos* и *Vasa* (Dill, Seaver, 2008). Большое внимание уделяется возможному участию MAP-киназного сигналинга и канонического Wnt/ β -катенинового пути в раннем развитии бластомеров с мезодермальной судьбой (Lambert, Nagy, 2001; Henry, 2014). Подобные пионерные исследования очертили круг возможных молекулярных участников мезодермальной генной регуляторной сети у представителей *Spiralia*. Однако определенных закономерностей и очевидных гомологий пока выявить не удастся, а порой противоречивость данных делает картину раннего развития спиралий еще более запутанной, чем казалось ранее. Очевидно, такая ситуация требует целенаправленного сравнительного изучения конкретных аспектов развития на ряде родственных объектов и более тщательный подбор новых модельных организмов.

Одной из успешно разрабатываемых моделей среди *Spiralia* являются нереидные полихеты (сем. Nereididae), которые дошли до наших дней в относительно малоизмененном состоянии и обладают множеством древних признаков. Консервативными признаками, унаследованными от общего предка

билатеральных животных, принято считать раннекембрийское происхождение, обитание в морской среде, план строения сегментированного тела, амфистомию, определенный набор семейств генов, соотношение паттернов их экспрессии и ряд особенностей организации генома. Нереид часто называют “живыми ископаемыми”, подчеркивая их преимущества над эволюционно продвинутыми, но тщательно проработанными в методическом плане модельными объектами – дрозофилой и *Caenorhabditis elegans*, которые независимо утратили некоторые древние признаки, сохранившиеся в измененном состоянии даже у позвоночных. Такая ситуация делает нереид более предпочтительным объектом для изучения в сравнительном аспекте. В этой связи относительно хорошо разработанными объектами среди полихет стали нереиды *Platynereis dumerilii*, *Alitta virens* (ранее – *Nereis virens*), *Neanthes arenaceodentata* (Fischer, Dorresteijn, 2004; Kulakova et al., 2007; Winchell et al., 2010). Для них созданы протоколы искусственного оплодотворения и получения культур развития, а также адаптированы современные методы выявления специфических белков и мРНК у зародышей. На *P. dumerilii* в последние годы начали применять технологии трансгенеза и мутационного анализа, которые естественно нуждаются в дальнейшем совершенствовании. Эти обстоятельства, а также успешный многолетний опыт работы кафедры эмбриологии ЛГУ/СПбГУ на нереидах предопределил выбор объектов данного исследования.

Цель работы – выявить клеточные и молекулярные основы развития мезодермы у Spiralia на примере нереидных полихет *Alitta virens* и *Platynereis dumerilii*.

Задачи:

1. Идентифицировать у нереид и описать структурно-функциональную организацию консервативных генов, участвующих в развитии мезодермы (гомологи *Twist*, *Mox*, *Evx*, *Vasa*, *PL10*, *Piwi*).
2. Изучить пространственно-временную экспрессию выделенных генов.
3. Подобрать для нереид новые методы прижизненного и функционального анализа генов интереса для дальнейшего изучения их роли в развитии мезодермы.
4. Раскрыть возможную роль MAP-киназного сигналинга в спецификации и морфогенезе мезодермы.

Научная новизна. Работа выполнена с привлечением широчайшего спектра современных методик, с совершенствованием и проверкой новых технических приемов. Комплексный анализ проблемы достигнут сочетанием описательных морфологических, молекулярно-генетических и функциональных подходов. При этом во главу ставилась именно проблема ранней спецификации, паттернирования и морфогенеза мезодермы, а не анализ возможных молекулярных детерминантов и их активность на разнообразных стадиях онтогенеза. Выявленные нами принципиально новые для Spiralia закономерности активности некоторых генов интереса и MAPK-сигналинга интерпретируются в сравнительном и эволюционном аспектах на основе аналитического сопоставления исчерпывающей подборки литературных источников. Достигнутый нами прогресс в методическом совершенствовании прижизненных и функциональных подходов к изучению регуляции развития мезодермы у *P. dumerilii* является нашим новым и весьма востребованным результатом.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты важны для понимания молекулярного профиля мезодермы у спиральных животных, путей приобретения мезодермальной идентичности и морфогенеза этого зачатка. Определение консервативных универсальных механизмов развития позволяет реконструировать общего предка анализируемых групп. Сравнение выявленных у нереид закономерностей с другими представителями первично- и вторичноротых делает возможным воссоздать облик Urbilateria – гипотетического предка всех трехслойных животных. Сделанные нами обобщения по этому поводу позволяют с большей надежностью различать плезиоморфные (древние) и апоморфные (продвинутые) признаки, а также описывать эволюционные события на уровне изменения активности генов и искать причины закрепления таких регуляторных состояний.

С практической точки зрения чрезвычайно ценны подобранные и усовершенствованные методы молекулярно-генетических манипуляций на нереидах. Дальнейшие работы с применением трансгенеза и мутационного анализа, безусловно, будут более продуктивны с учетом представленных наработок. Последовательности впервые клонированных для *A. virens* и *P. dumerilii* генов загружены в базы данных, доступные для научного сообщества, и могут быть использованы для дальнейшего анализа молекулярной эволюции семейств соответствующих генов. Результаты исследования используются в учебном процессе на биологическом факультете СПбГУ. Изложенные и опубликованные данные включены в лекционные курсы по эволюционной биологии развития и эмбриологии. Препараты экспрессии генов служат методическим материалом на практических занятиях, демонстрирующих молекулярную природу дифференцировки мезодермы и генетическую обусловленность процессов развития.

Методология и методы исследования. Был применен как описательный, так и экспериментальный подход. Наблюдения проводили на живом и фиксированном материале развития. Для этого по протоколу искусственного оплодотворения получали синхронные эмбриональные культуры *Alitta virens* (от производителей дикого типа) и *Platynereis dumerilii* (от животных дикого типа, а также из инбредных и трансгенных линий). В зиготы *P. dumerilii* с помощью микроинъекций доставляли различные мРНК и ДНК. При фиксации стадий развития использовали сотни объектов. Выявление специфических эндогенных белков и мРНК в клетках зародышей и личинок проводили на тотальных препаратах по протоколу иммуноцитохимии и молекулярной гибридизации *in situ* (whole mount *in situ* hybridisation, WMISH).

Среди молекулярно-биологических методик использовали: выделение мРНК, обратную транскрипцию, клонирование генов, рестрикционный анализ, блоттинг и гибридизацию по Саузерну, транскрипцию *in vitro*, конструирование репортерных трансгенов и сайт-специфических нуклеаз TALEN, рекомбинацию бактериальных искусственных хромосом (BAC), проверку активности транспозазы в клетках зародышей. Среди различных вариантов полимеразной цепной реакции (ПЦР) были ПЦР со специфическими праймерами на кДНК и гДНК, вырожденная ПЦР, гнездовая ПЦР, тачдаун-ПЦР (touchdown PCR), RACE-ПЦР, полуколичественная ПЦР с обратной транскрипцией RT-ПЦР (ОТ-ПЦР), TAIL-ПЦР (Thermal Asymmetric

Interlaced PCR). Широкое применение получили методы анализа *in silico*, включая моделирование филогенетических схем, предсказание структуры генетических локусов, аннотирование последовательностей мРНК и белков.

Для оценки значимости молекулярных факторов применяли методологию “утрата функции” (loss-of-function). MAP-киназный сигналинг подавляли фармакологическим агентом U0126. Нокаут гена *Pdu-twist* проводили с помощью TALEN-индуцированного мутагенеза.

Положения, выносимые на защиту

1. В геномах нереид *A. virens* и *P. dumerilii* присутствуют консервативные для *Spiralia* мезодермальные регуляторные факторы – гомологи генов *Twist*, *Mox*, *Evx*, *Vasa*, *PL10*, *Piwi*.
2. Эти факторы дифференциально экспрессируются в ходе эмбрионального и личиночного развития *A. virens*, придавая мезодермальным клеткам уникальное регуляторное состояние.
3. На стадиях дробления у нереид выявлены активные компоненты MAP-киназного сигнального пути, которые важны для морфогенеза мезодермальных полосок.
4. Впервые опробованные на *P. dumerilii* генетические методы (трансгенез и мутагенез) и сформулированные методические рекомендации открывают качественно новые возможности исследования мезодермы у *Spiralia*.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты и выводы работы имеют высокую степень достоверности, поскольку получены с помощью комплекса разных методов на двух объектах с применением повторностей, контролей и статистической обработки. Журнальные публикации автора прошли тщательное рецензирование и активно цитируются. Полученные данные опубликованы в 12 работах. Из них 4 статьи в специализированных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых WoSCC и Scopus, в том числе 3 на английском языке, и 8 тезисов конференций. Автором работы были сделаны устные доклады на III Конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012 г.), на Всероссийской конференции с международным участием “Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция” (Санкт-Петербург, 2013 г.), на Международном V съезде Европейского Общества Эволюционной Биологии Развития (Вена, Австрия, 2014 г.), на Всероссийской конференции “Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: устойчивость и вариабельность” (Москва, 2015 г.), на III Всероссийской конференции с международным участием “Современные проблемы эволюционной морфологии животных” (Санкт-Петербург, 2016 г.), а также на научных семинарах кафедр эмбриологии и зоологии беспозвоночных биологического факультета СПбГУ. Стендовые доклады представлялись на Международной конференции “Современные методы микроскопии в биологии и медицине” (Санкт-Петербург, 2009 г.), на Международной конференции “Каспар Фридрих Вольф и современная биология развития” (Санкт-Петербург, 2009 г.), на Международном IV съезде Европейского Общества Эволюционной Биологии Развития (Лиссабон, Португалия, 2012 г.).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 189 страницах и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, который включает 341 источник. Рукопись содержит 58 рисунков и 3 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В данной главе изложены классические представления о механизмах развития и современное состояние проблемы формирования мезодермы в онтогенезе и эволюции. Проанализированы молекулярные механизмы миогенной дифференцировки и роль консервативных регуляторных генов. Охарактеризованы важнейшие аспекты развития мезодермы у *Spiralia* и биологии нереидных полихет.

Материалы и методы. Эмбриональные культуры *A. virens* и *P. dumerilii* получали в полевых (на МБС СПбГУ) и лабораторных условиях (на каф. эмбриологии СПбГУ и в МФПЛ Университета Вены). Из зародышей различных стадий (время развития приводится в часах после оплодотворения – чпо) выделяли мРНК и гДНК. Из мРНК с помощью обратной транскрипции получали кДНК. Из библиотек кДНК в различных вариантах ПЦР (вырожденная ПЦР, RACE-ПЦР и др.) амплифицировали фрагменты генов интереса и клонировали их в вектор. Некоторые фрагменты гомологов *Twist*, *Eux*, *Vasa*, *PL10* и *Piwi* у *A. virens* были получены от Р.П. Костюченко. С помощью транскрипции *in vitro* на клонированных фрагментах получали меченые дигоксигенином антисмысловые РНК-зонды. Их использовали в гибридизации *in situ* на тотальных препаратах (WMISH), позволяющей выявить у зафиксированных объектов домены экспрессии генов интереса (т.е. клетки, содержащие эндогенную мРНК). Гибридизацию с зондом проводили при +65°C 1–2 дня, после чего инкубировали зародыши в антителях против дигоксигенина, конъюгированных с щелочной фосфатазой. Для проявления сигнала использовали субстрат BCIP/NBT. Иммуноцитохимическое выявление белков проводили с флуоресцентными антителями.

Последовательности генетических локусов определяли секвенированием ВАС-клонов. Для этого в геномной ВАС-библиотеке *A. virens* с помощью саузерн-гибридизации с зондом из кДНК находили нужные клоны и проверяли их рестрикционным анализом. Воссоздание последовательности гДНК из контигов дополнялось секвенированием ВАС по Сэнгеру, сравнением с последовательностями из базы данных генома *P. dumerilii* и предсказанием CDS в гДНК *in silico* с последующей ПЦР со специфическими праймерами и секвенированием продуктов, а также TAIL-ПЦР.

Анализ генов интереса проводили с помощью программ CLC Main Workbench, BioEdit, ApE и on-line сервисов BLAST, SIM4, Splign, FGGENESH, Augustus, Mulan, REPFIND, UTRSite, Pfam, PROSITE. Филогенетический анализ осуществляли на сервере Phylogeny.fr. Аминокислотные последовательности ортологов выравнивали по алгоритму MUSCLE 3.7 и строили дендрограмму методом максимального правдоподобия PhyML 3.0 с aLRT-тестом.

Для подбора перспективной стратегии трансгена у *P. dumerilii* проверяли активность транспозазы *Mos1 in vivo*. Для этого в зиготы инъецировали плазмидную ДНК вектора-донора с или без мРНК транспозазы. Характер вырезания трансгена из вектора анализировали с помощью гнездовой ПЦР на инъецированных зародышах, клонирования, секвенирования и выравнивания ампликонов. Для расшифровки последовательности ДНК, граничащей с интегрированным в геном *P. dumerilii* трансгеном на основе транспозона *Mos1*, из червей линий *tuba::egfp^{vbcil}* и г-

opsin::egfp^{vbc12} выделяли гДНК и использовали в 4 сериях ТАИЛ-ПЦР. Ампликоны, клонировали, секвенировали и выравнивали с последовательностью вектора-донора.

У *P. dumerilii* изучали регуляцию экспрессии гена *Twist*. С помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР) был установлен относительный уровень экспрессии в ходе эмбрионального и ларвального развития. Репортерную конструкцию для трансгеноза создавали по протоколу ВАС-рекомбинации. В идентифицированной ВАС с локусом *Twist* в кодирующую область гена встраивали последовательность зеленого флуоресцентного белка (GFP). Препараты ДНК с рекомбинантной ВАС инъецировали в зиготы и анализировали экспрессию трансгена у зародышей и личинок прижизненно. Для отработки методов мутагенеза конструировали сайт-специфические нуклеазы TALEN, способные нарушить кодирующую последовательность *Twist*. В зиготы инъецировали синтезированную мРНК TALEN и генотипировали зародышей и ювенильных червей с помощью ПЦР на гДНК.

Модуляция MAP-киназного сигналинга проводилась в растворе MEK-ингибитора U0126 в период раннего развития *A. virens* – на стадиях дробления и начала гастрюляции. Объекты из эксперимента и контроля изучали на светооптическом уровне прижизненно, а также с помощью гибридизации *in situ*, морфометрии и статистической обработки.

Результаты гибридизации *in situ*, иммуоцитохимии и экспериментов по трансгенезу анализировали с помощью методов световой, флуоресцентной и лазерной конфокальной микроскопии. Обработку иллюстративного материала проводили в программах Adobe Photoshop CS 5.1, ImageJ, AxioVision 4.8, LAS AF Lite, Microsoft Publisher 2010 и Adobe Illustrator CS 5.1.

Результаты и обсуждение

Молекулярные регуляторы развития мезодермы нереид и используемые методические подходы для их анализа. По литературным данным был определен набор генов интереса – возможных участников программы развития мезодермы *Spiralia*. У полихеты *A. virens* были обнаружены и впервые проанализированы фрагменты генов *Twist*, *Mox*, *Evx*, *Vasa*, *PL10* и *Piwi*, гомолог *Twist* был также идентифицирован и отклонирован для *P. dumerilii*. Из просеквенированных участков кДНК и гДНК были восстановлены полноразмерные последовательности, содержащие 5' UTR, белок-кодирующую часть (CDS) и 3' UTR для генов *Twist*, *Evx*, *Vasa*, и *Piwi* (Рис. 1). Протяженные последовательности *Mox* и *PL10* остались неполными на 3' конце. У обеих полихет было обнаружено по два паралогичных гена *Piwi* (*Piwi1* и *Piwi2*), для остальных генов удалось найти по одному гомологу. Идентифицированные гены *A. virens* были названы *Avi-twist*, *Avi-mox*, *Avi-evx*, *Avi-vasa*, *Avi-pl10*, *Avi-piwi1* и *Avi-piwi2*.

По построенным филогенетическим схемам можно судить, что для генов нереид в целом характерна короткая длина ветвей, что отражает малую степень дивергенции этих последовательностей. Топология дендрограмм *Mox*, *Vasa*, *PL10* и *Piwi* показывает совместную кластеризацию гомологов *Spiralia*. Экзон-интронная и доменная структура изученных генов проявляет большой консерватизм – присутствуют характерные для каждого семейства функциональные домены; комплексное устройство генов с множеством экзонов отвечает анцестральному для

Metazoa типу организации генома (Raible et al., 2005). Все исследованные гомологи регуляторных генов экспрессировались в мезодермальных зачатках, что указывает на их участие в программе развития.

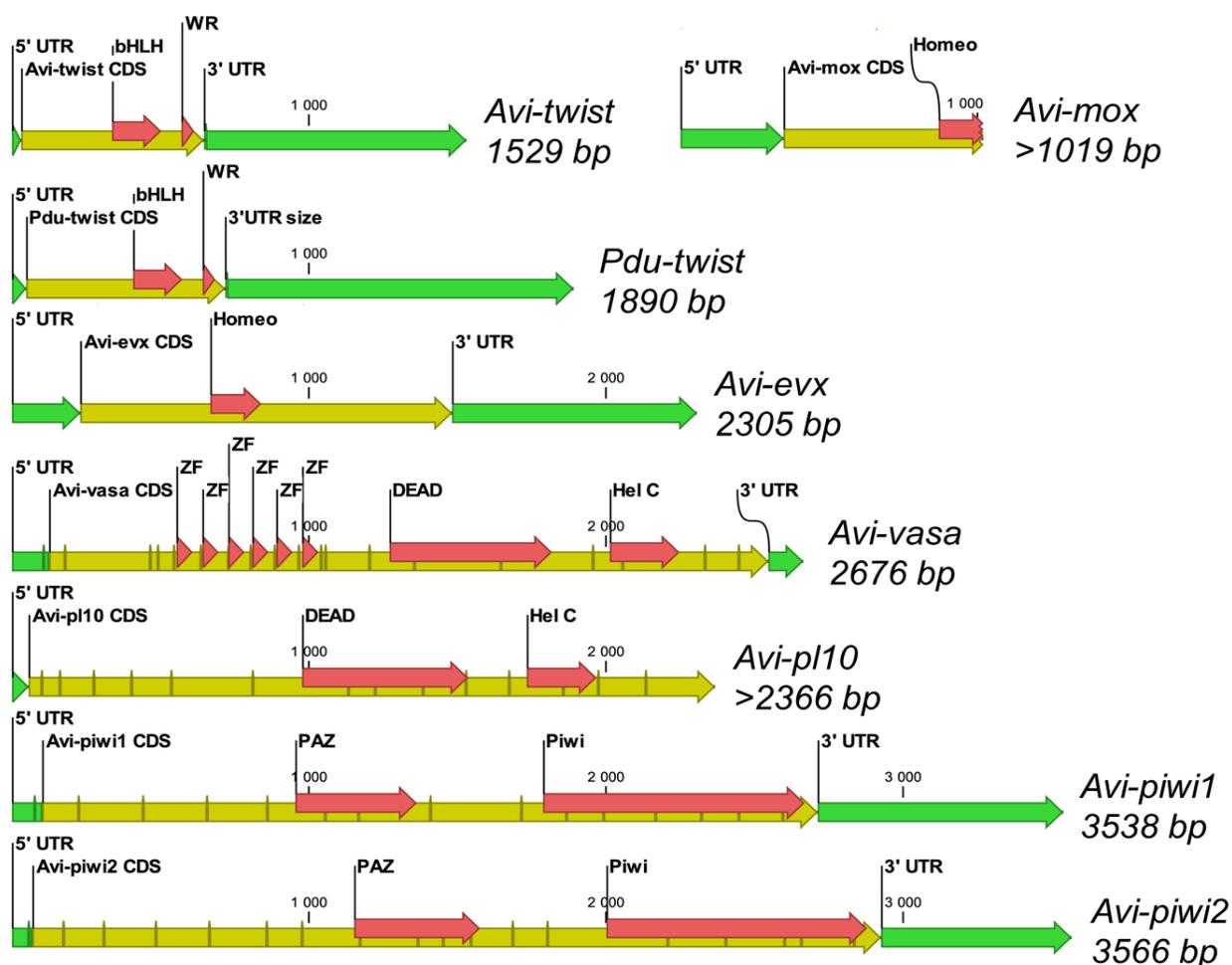


Рис. 1. Структура транскриптов проанализированных генов интереса. Зелеными блоками отмечена нетранслируемая часть (UTR), белок-кодирующая область (CDS) выделена оливковым, вертикальные линии внутри блоков маркируют границы экзонов. Красные блоки показывают участки, кодирующие в белке консервативные домены. Цифрами обозначена длина последовательности кДНК в bp.

С целью совершенствования методов анализа генов интереса на *P. dumerilii* отработывали технологии транспозон-опосредованного трансгенеза. В частности изучали механизм транспозиции, т.е. параметры вырезания и встраивания репортерной конструкции на основе транспозона Mos1 в геном *P. dumerilii*. Проанализировав участки вектора-донора после вырезания транспозона (Рис. 2), а также участки гДНК на границе наследуемых трансгенов, была установлена необычная активность Mos1, не показанная ранее на других моделях. Неканонический характер работы Mos1 заключался в вариабельности границ вырезания и встраивания трансгена с возможностью множественной интеграции различных фрагментов в один геномный локус. Это помогает объяснить невысокую эффективность (<5%) трансгенеза *P. dumerilii* с использованием Mos1 и делает очевидным необходимость разработки более надежных технологий, например на основе интегразы phiC31.

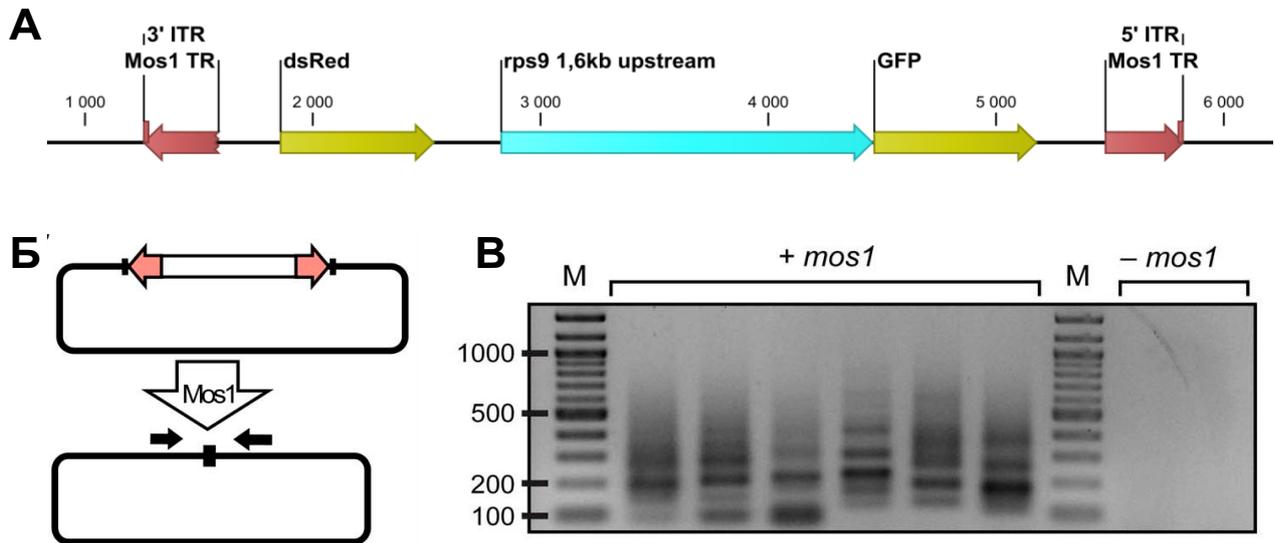


Рис. 2. Вырезание трансгена на основе транспозона Mos1 из вектора в зависимости от наличия транспозазы. А – строение трансгена, цифрами обозначена длина последовательности в bp. На границах трансгена расположены терминальные повторы (Mos1 TR, красные блоки), оканчивающиеся 3' и 5' инвертированными повторами (ITR). Трансген кодирует флуоресцентные маркеры dsRed и GFP (оливковые блоки) и промоторную область гена *Pdu-rps9* (циановый). Б – строение вектора-донора до и после вырезания трансгена. Черные стрелки показывают положение праймеров для скрининга. В – результаты гнездовой ПЦР на зародышах, инъецированных вектором с (+ *mos1*) или без (– *mos1*) мРНК транспозазы. М – дорожка с маркером молекулярного веса 2-Log (NEB), цифрами слева обозначена длина фрагментов ДНК в bp.

В другом эксперименте нами впервые был проделан трансгенез *P. dumerilii* с рекомбинантной ВАС, содержащей геномный локус *A. virens*. Репортерный трансген обеспечил рекапитуляцию экспрессии гена *Twist* и в экто- и в энтомеэодерме (Рис. 3). По времени появления сигнала GFP можно судить о запуске зиготической транскрипции *Twist*, которая приурочена к началу гаструляции (9 чпо). Этот факт подтверждают и результаты РТ-ПЦР. Транскрипты *Pdu-twist* присутствуют еще в неоплодотворенном яйце, но со стадии гаструлы относительный уровень мРНК возрастает в несколько раз, что указывает на активацию зиготической экспрессии.

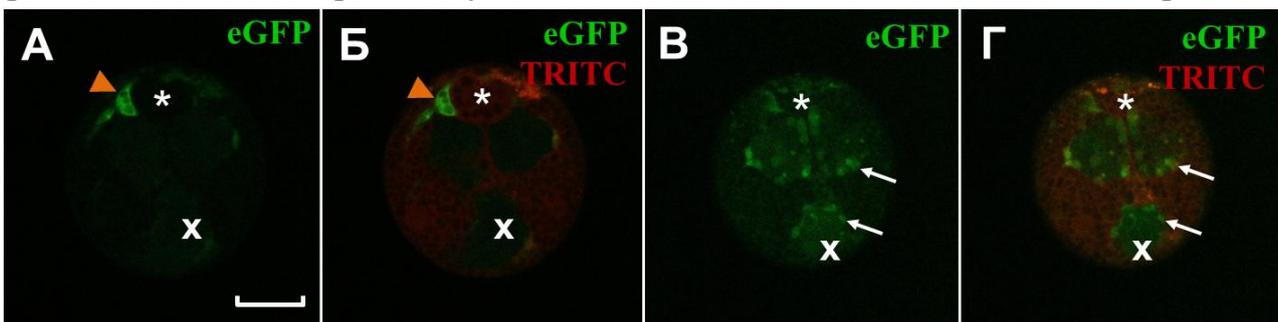


Рис. 3. Экспрессия трансгена *Avi-twist::eGFP-F2A-NTR* у средних трохофор *P. dumerilii* (36 чпо). Прижизненные наблюдения, максимальная проекция конфокального Z-стека, каналы подписаны в верхнем правом углу: eGFP (зеленый), TRITC (красный). Вентральная проекция одного и того же объекта в разных фокальных плоскостях. Экспрессия eGFP в энтомеэодермальных клетках показана белыми стрелками, экспрессия в эктомеэодерме – оранжевыми треугольниками, X – вегетативный полюс (область проктодеума), звездочка – область стомодеума. Масштаб 50 мкм.

По протоколу совершенно нового метода обратной генетики получены конструкции нуклеаз TALEN, специфичных к кодирующей области *Pdu-twist*. Нами

отрабатывались условия доставки мРНК TALEN в зиготы и методы скрининга мутаций. Наиболее эффективная пара TALEN *twi-3L/R* обеспечила вероятность получения indel-мутаций от 17% до 51%. Эта конструкция обладала наиболее длинными сайтами связывания ДНК-мишени (по 17 bp) и наибольшим спейсером (16 bp). Все варианты мутаций приводили к сдвигу рамки считывания и, следовательно, нокауту *Pdu-twist* (Рис. 4). Эти результаты дают уверенность в продуктивности апробированного метода и являются первым этапом для получения нокаутной линии животных.

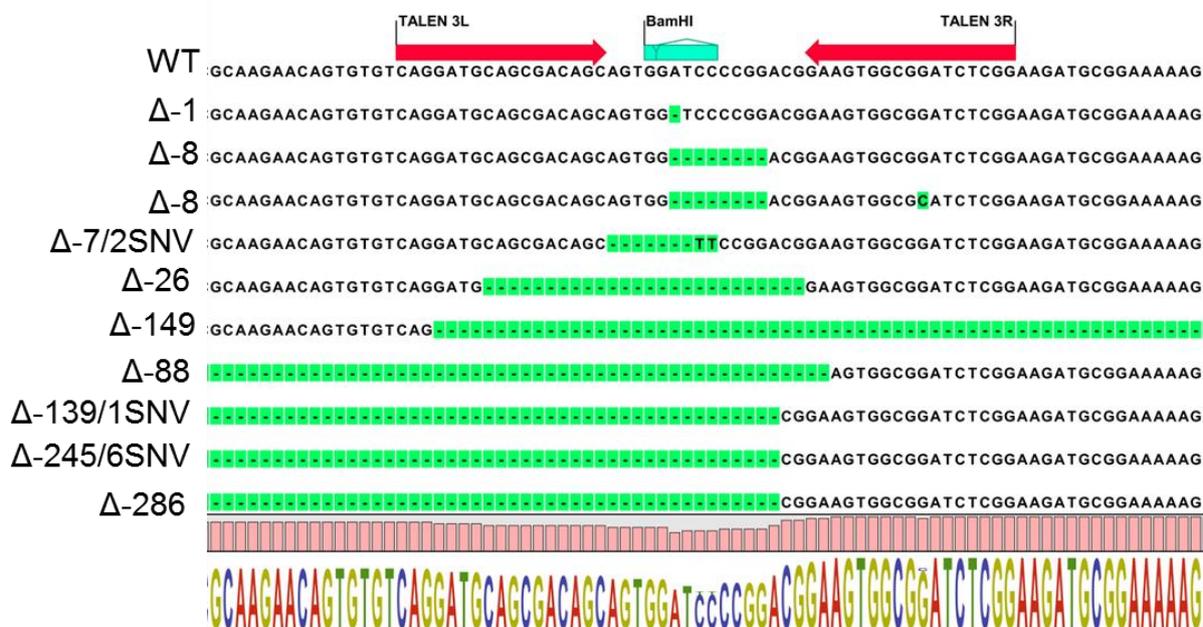


Рис. 4. Выравнивание ампликонов первого экзона *Pdu-twist*, полученных после ПЦР-скрининга TALEN-индуцированных мутаций. Положение TALEN *twi-3L/R* показано красными блоками сверху на последовательности дикого типа (WT), рестрикционный сайт *Bam*HI в спейсере – циановым. Несовпадающие с диким типом позиции выделены зеленым, отсутствующие нуклеотиды – знаком -, обозначение мутаций приведено слева: за префиксом Δ- указана длина делеции в bp, перед аббревиатурой SNV (single nucleotide variant) приведено количество нуклеотидных замен.

Спецификация и паттернирование мезодермы. Энтомезодерма *A. virens*, как и у других нереид, происходит из бластомера 4d. В результате его билатерального деления образуются М-клетки, лежащие на дорсальной границе презумптивного бластопора (Рис. 5). По результатам гибридизации *in situ* наиболее ранним маркером этой клеточной линии является *Avi-twist*. В ходе дробления мРНК *Avi-twist* преимущественно локализуется в свободной от желтка цитоплазме в различных бластомерах D квадранта, но в конце этой фазы развития экспрессия выявляется исключительно в клетках М. К началу гаструляции транскрипты *Avi-twist* появляются еще в четырех крупных клетках края бластопора – микромерах 3a–3d (Рис. 5Б), которые представляют собой полный набор эктомезодермальных предшественников. Таким образом, *Twist* у *A. virens* проявляет панмезодермальную тканеспецифичность, что установлено для регуляторного гена *Spiralia* впервые. Циркумбластопоральная активность этого регуляторного фактора не была показана в развитии ни одного из моллюсков и аннелид ранее, но похожий паттерн выявлен на стадии гаструлы у брахиоподы (Passamanek et al., 2015). Эти данные

поддерживают идею, что закладка мезодермы по краю бластопора эволюционно первична (анцестральна) для *Bilateria* (Lartillot et al., 2002; Martindale et al., 2004). Кроме того, на основе значительного консерватизма паттернов экспрессии и функции *Twist* у *Bilateria*, можно предположить, что у нереид материнские продукты *Twist* участвуют в автономной спецификации энтомезодермы.

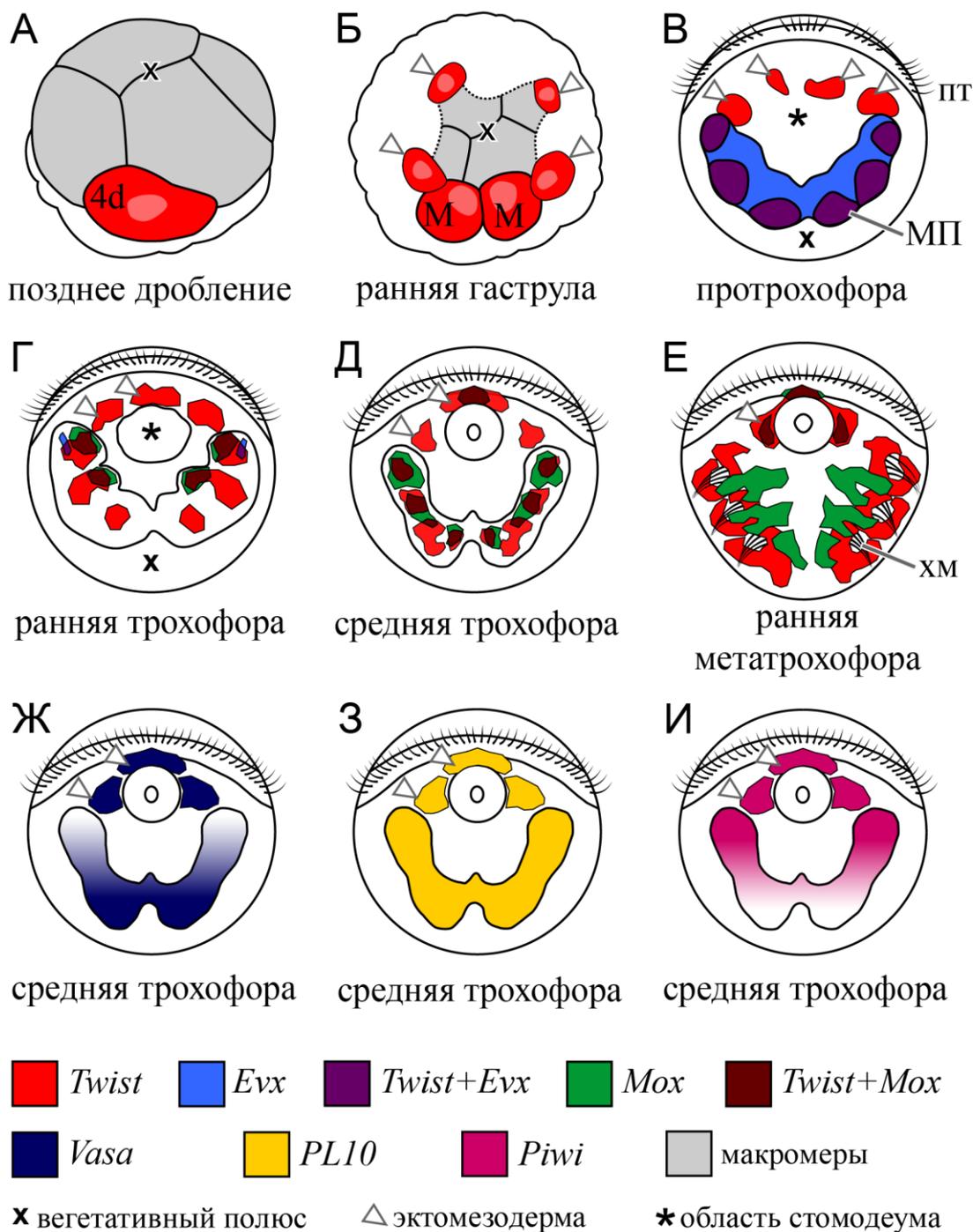


Рис. 5. Морфогенез и молекулярное паттернирование мезодермы у *A. virens*. Отображены только мезодермальные домены экспрессии *Twist* (красный), *Evx* (голубой), *Mox* (зеленый), *Vasa* (синий градиент), *PL10* (желтый), *Piwi* (розовый градиент). Области перекрытия экспрессии *Twist* и *Evx* показаны фиолетовым, *Twist* и *Mox* – коричневым. Стадия развития указана под каждым изображением. А, Б – вегетативная проекция, дорсальная сторона снизу, экспрессия наблюдается в клетках-основательницах энтомезодермы (бластомеры 4d и М) и эктомезодермы. Макромеры на дне бластопора (серая заливка) и мезодерма интернализуются в ходе гастрюляции

за счет обрастания эктодермой (белая заливка). Пунктиром на Б обозначены вентральный и латеральные края бластопора. В–И – вентральная проекция, анимальный полюс вверх. В – пролиферация М-клеток дает начало мезодермальным полоскам (МП), которые распространяются вперед, экспрессируя *Evx* (во всех клетках) и *Twist* (в отдельных клетках по всей длине МП). Г, Д, Ж–И – у трохофор количество мезодермальных клеток продолжает увеличиваться, МП разрастаются латерально (вдоль дорсовентральной оси). *Twist* и *Mox* экспрессируются в перекрывающихся энтомезодермальных доменах, демонстрируя метамерный билатеральный паттерн (Г, Д). Ж–И – *Vasa* и *Piwi* имеют встречно направленные градиенты экспрессии в МП, сигнал *PL10* распределен по мезодерме равномерно. Е – к стадии ранней метатрохофоры домены экспрессии *Twist* и *Mox* в энтомезодерме сегрегируются и более не пересекаются. Энтомезодермальная экспрессия обозначена белым треугольником, Х – вегетативный полюс, звездочка – область стомодеума, пт – прототрох, хм – хетоносный мешок.

Начиная со стадии гастролы, мезодермальные зачатки обнаруживают у *A. virens* динамично меняющийся во времени молекулярный профиль. Мы наблюдали последовательную активацию экспрессии *Avi-twist*, *Avi-evx*, *Avi-vasa*, *Avi-pl10*, *Avi-piwi1*, *Avi-piwi2* и, наконец, *Avi-mox* в развивающихся МП (Рис. 5). На стадиях протрохофоры–ранней трохофоры транскрипты всех изученных генов дифференциально распределены в пределах частично перекрывающихся доменов. Для *Avi-twist* и *Avi-mox* характерна исключительно мезодермальная тканеспецифичность, тогда как остальные гены интереса проявляют свою активность еще и в эктодермальных зачатках. Наблюдаемая картина сложного сочетания мезодермальных доменов экспрессии должна отражать раннюю гетерогенность морфологически недифференцированных МП. По-видимому, этот дифференциальный молекулярный статус различных областей МП является основой для дальнейшей сегрегации мезодермальных линий у более зрелых личинок. И действительно, у средних трохофор перекрывание доменов экспрессии становится значительно меньше, а у ранних метатрохофор паттерны активности гомологов *Twist*, *Mox*, *Evx* и вовсе не пересекаются в пределах энтомезодермы. Несколько иначе происходит индивидуализация паттернов экспрессии гомологов *Vasa*, *PL10*, *Piwi*: к стадии ранней метатрохофоры уровень их активности заметно снижается; встречно направленные вдоль МП градиенты экспрессии *Avi-piwi1* (переднезадний) и *Avi-vasa* (заднепередний) затухают; появляются признаки метамерности сигнала с его наибольшей интенсивностью в доменах, частично или полностью повторяющих экспрессию *Avi-twist*.

Таким образом, очевидно, что динамика экспрессии избранных генов интереса отражает прогрессивную детерминацию различных мезодермальных зачатков. Эта пространственная неоднородность вдоль переднезадней оси МП может быть продемонстрирована экспрессией *Avi-piwi1* и *Avi-vasa*. Различная судьба клеток МП вдоль дорсовентральной оси, вероятно, обуславливается размежеванием областей активности *Avi-twist* (экспрессируется в латерально расположенных зачатках параподиальных мышц) и *Avi-mox* (преобладает на вентральной стороне на месте развития косых мышц и/или целомических мешков). Весьма похожий переход от перекрывающихся к неперекрывающимся паттернам экспрессии *Twist* и *Mox* происходит в развитии ланцетника (Yasui et al., 1998; Minguillón, Garcia-Fernández, 2002) и брахиоподы (Passamanek et al., 2015). У морского ежа, по-видимому, аналогичный процесс сегрегации мезодермальных зачатков начинается уже на

стадии ранней гастролы (Andrikou et al., 2013). Примечательно, что специфичность регуляторных генов-участников у зародышей иглокожих мало сопоставима с тем, что наблюдается у спиралей (к примеру, транскрипты *Twist* выявляются в целомических мешках, а *Mox* и вовсе не экспрессируется в мезодерме). Следовательно, создание таксон-специфичного набора мезодермальных зачатков могло идти независимо в разных филогенетических линиях с привлечением различных управляющих генов. Однако в целом среди этих регуляторных генов прослеживается определенное единообразие: одни и те же мезодермальные факторы зачастую используются дальнеродственными организмами. При этом максимальное сходство специфичности наблюдается сразу после обособления мезодермы (во время гастрологии) и при сравнении наиболее медленно эволюционировавших, т.е. наиболее базальных, таксонов (антозои среди кишечнополостных, эррантные полихеты среди аннелид, головохордовые среди хордовых и т.д.). Проверенный набор регуляторных генов продемонстрировал высокую степень консерватизма мезодермальной тканеспецифичности среди Spiralia. Это позволяет нам с уверенностью включить эти факторы в состав анцестральной программы развития мезодермы спиралей. Изучение эволюционных преобразований данной морфогенетической программы является, по нашему мнению, отправной точкой для объяснения разнообразия уровней организации мезодермальных тканей Spiralia.

В связи с проблемой сегментации мезодермы аннелид нами получены новые и весьма ценные сведения. В ходе развития энтомеодермальные паттерны активности гомологов *Twist*, *Mox*, *Vasa* и *Piwi* метамеризуются в гипосфере трохофоры *A. virens* (Рис. 5). Вместе с известным посегментным распределением продуктов других регуляторных генов (*Engrailed*, *Gbx*, некоторые *Hox* и *NK*) эти молекулярные данные указывают на скрытую метамерную организацию первичной трохофорной личинки. Мы полагаем, что циркумбластопоральная закладка и ранняя метамеризация мезодермы нереид отражает эволюционную историю формирования третьего зародышевого листка и подтверждает, что общий предок трехслойных уже имел сегментированный целом. Наши данные поддерживают архицеломатную эволюционную гипотезу (Sedgwick, 1884), по которой круговое расположение камер кишечной полости (цикломерия) у радиально-симметричных предковых форм превратилось в метамерию первичных Bilateria.

Роль MAP-киназного сигналинга в формировании мезодермы. По полученным нами данным MAP-киназный сигнальный путь играет важную роль в раннем развитии нереид. мРНК гомологов MAPKK (*Mek*) и MAPK1/2 (*Erk1/2*) – ключевых терминальных элементов MAPK сигналинга – присутствует примерно на одном и том же уровне на протяжении всего эмбрионального и личиночного развития *P. dumerilii*. Иммуноцитохимически была описана активность MAP-киназы в определенных клеточных линиях ранних зародышей *A. virens*. Нам удалось выявить как минимум два периода неравномерного распределения киназы dpErk1/2 во время дробления (на четвертом и шестом–седьмом клеточном цикле). На восьмиклеточной стадии (завершение четвертого клеточного цикла) ядерный сигнал dpErk1/2 приурочен к дорсальным blastomeres 1c, 1d и 1D (Рис. 6А). На стадии 16 blastomeres dpErk1/2 выявлена во всех 12-ти микромерах, но отсутствует в макромерах (Рис. 6Б). Второй период с выраженной дорсовентральной полярностью

воздействии ингибитора U0126 до формирования соматобласта 4d. Такое подавление MAPK оказало отсроченный эффект на морфогенез МП, причем молекулярные признаки спецификации и паттернирования энтомерозодермы не были утрачены, т.к. мы наблюдали экспрессию *Avi-twist* и *Avi-mox*. Сходные нарушения организации МП были отмечены и у *P. dumerilii* (Козин, Костюченко, 2009). У личинок *A. virens* из экспериментов, начатых на стадии 8 бластомеров (I), 16 бластомеров (II) и 17 бластомеров (III) строение и форма МП была существенно нарушена. Вместо нормального метамерного паттерна экспрессии *Avi-twist* и *Avi-mox* на вегетативном полюсе трохофор наблюдались домены экспрессии в плотных клеточных конгломератах или в деформированных МП, сильно укороченных вдоль переднезадней оси (Рис. 7). У трохофор из эксперимента (IV), в котором ингибитор U0126 применялся после деления бластомера 3D, видимых отличий в экспрессии *Avi-twist* и *Avi-mox* по сравнению с контролем отмечено не было.

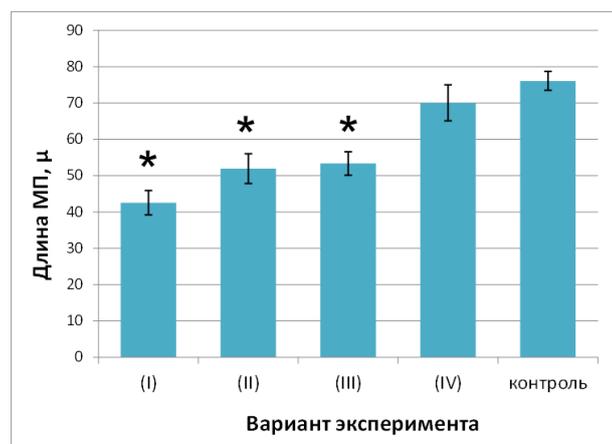


Рис. 7. Сравнение длины мезодермальных полосок у трохофор *A. virens* в норме и после воздействия ингибитором U0126. Показано среднее значение длины МП (n=18) у объектов из экспериментов (I), (II), (III), (IV) и в контроле (подписано на оси абсцисс). В качестве планок погрешности приведены значения 95% доверительного интервала. Звездочкой обозначено достоверное отличие от контроля.

Теоретически можно предположить, что MAP-киназный сигналинг у nereid 1) участвует в паттернировании всего зародыша, что необходимо для инструктивной регуляции морфогенеза МП извне или 2) обеспечивает определенные компетенции самой энтомерозодермы. По нашему мнению более вероятен второй сценарий, поскольку энтомерозодерма nereid сегрегируется от макромеров линии D в ряду делений клеток 1D, 2D, и, наконец, 3D. С этим согласуется, что 1D и 3D являются единственными макромерами с ранней активностью Erk1/2. У хордовых MAPK-зависимый FGF сигналинг имеет консервативную функцию непосредственной спецификации презумптивной мезодермы (Kim, Nishida, 2001; Böttcher, Niehrs, 2005; Green et al., 2013). Есть основания полагать, что MAPK у ряда моллюсков также является медиатором зависимой спецификации мезэнтодермального бластомера 3D (Lambert, Nagy, 2003). Таким образом, предполагаемая нами многократная активация MAPK у nereid связана с поэтапной детерминацией энтомерозодермы. При этом впервые показано, что MAPK на стадиях дробления отвечает за гастрюляционный морфогенез мезодермы, но не предопределяет образование мезодермального зачатка и его молекулярную разметку.

Выводы

1. *Avi-twist* и *Avi-mox* являются наиболее тканеспецифичными из известных ранних маркеров мезодермальных клеток у зародышей и личинок *A. virens*. Экспрессия этих генов в энтомерозодерме имеет метамерный характер, что, вместе с

- циркумбластопоральной активностью *Avi-twist* во время гаструляции, является эволюционно древней чертой развития мезодермы.
2. Гены *Avi-vasa*, *Avi-pl10*, *Avi-piwi1* и *Avi-piwi2* дифференциально экспрессируются в клетках разных зародышевых листков, вовлеченных в активные морфогенетические процессы. Наиболее интенсивная и продолжительная экспрессия в тканях мезодермальной природы указывает на их малодифференцированное состояние вплоть до продвинутых личиночных стадий.
 3. Картина сложного сочетания доменов экспрессии *Avi-twist*, *Avi-mox*, *Avi-evx*, *Avi-vasa*, *Avi-pl10*, *Avi-piwi1*, *Avi-piwi2* отражает раннюю гетерогенность недифференцированных мезодермальных полосок. Такой молекулярный профиль может служить основой для дальнейшей сегрегации мезодермальных производных.
 4. Во время дробления MAP-киназный сигналинг у *A. virens* необходим для реализации нормального морфогенеза энтомезодермы, но не детерминирует ее спецификацию и паттернирование.
 5. Структурно-функциональная организация и филогенетическое положение гомологов генов *Twist*, *Mox*, *Evx*, *Vasa*, *PL10*, *Piwi* у *A. virens* и *P. dumerilii* свидетельствует о малой степени дивергенции их последовательностей и сохранении анцестральных черт в генетическом аппарате нереид.
 6. Доставка искусственных генетических репортерных конструкций в геном *P. dumerilii* с помощью транспозона *Mos1* малоэффективна, поскольку вырезание трансгена из донорного вектора и его встраивание в гДНК клеток зародыша осуществляется в неканонической нерегулярной манере.
 7. Трансгенез на основе рекомбинантных ВАС и мутагенез посредством сайт-специфических нуклеаз TALEN являются перспективными методами прижизненного и функционального анализа регуляторов развития нереид (в частности мезодермального фактора *Twist*).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи и тезисы в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Козин В.В., Костюченко Р.П. Эволюционный консерватизм и вариабельность развития мезодермы у Spiralia: неповторимый паттерн нереидных полихет // Известия РАН. Серия биологическая. 2016. № 3. С. 265–275.
2. Козин В.В., Костюченко Р.П. Свидетельства мультипотентного состояния клеток зоны роста полихеты *Nereis virens* // Цитология. 2012. Т. 54. № 4. С. 342–343.
3. Kozin V.V., Filimonova D.A., Kupriashova E.E., Kostyuchenko R.P. Mesoderm patterning and morphogenesis in the polychaete *Alitta virens* (Spiralia, Annelida): Expression of mesodermal markers *Twist*, *Mox*, *Evx* and functional role for MAP kinase signaling // Mech. Dev. 2016. V. 140. P. 1–11.
4. Kozin V.V., Kostyuchenko R.P. *Vasa*, *PL10*, and *Piwi* gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens* // Dev. Genes Evol. 2015. V. 225. № 3. P. 129–138.

5. Backfisch B., Kozin V.V., Kirchmaier S., Tessmar-Raible K., Raible F. Tools for gene-regulatory analyses in the marine annelid *Platynereis dumerilii* // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 4. P. e93076.

Тезисы в материалах конференций:

1. Козин В.В., Гук Д.В., Филиппова Н.А., Костюченко Р.П. Спецификация и дифференциация мезодермы у нереидных полихет (Spiralia, Annelida) // Материалы конференции “Современные проблемы эволюционной морфологии животных”. Санкт-Петербург, 2016. С. 60–61.
2. Козин В.В., Филимонова Д.А., Костюченко Р.П. Морфогенетические процессы развития мезодермы у Spiralia: эволюционный консерватизм и вариации // Конференция “Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: устойчивость и вариабельность”. Тезисы. Москва, 2015. С. 28–29.
3. Козин В.В. Современный этап в изучении развития и репродукции нереидных полихет – создание трансгенных и нокаутированных животных // Конференция “Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция”. Тезисы. Изд-во ВВМ, Санкт-Петербург, 2013. С. 63–64.
4. Козин В.В., Костюченко Р.П. Формирование личиночной мезодермы у *Nereis virens* и *Platynereis dumerilii* (Polychaeta, Annelida) // Конференция “Каспар Фридрих Вольф и современная биология развития”. Тезисы. Санкт-Петербург, 2009. С. 39–42.
5. Kozin V.V., Raible F., Kostyuchenko R.P. Designing a mesodermal molecular toolkit in the marine annelids *Alitta virens* and *Platynereis dumerilii* // EURO EVO DEVO 22–25 July 2014. Vienna, 2014. P. 254–255.
6. Kozin V.V., Kostyuchenko R.P. MAP kinase signaling in cell fate and dorsoventral axis specification during Spiralia embryogenesis // Euro Evo Devo Lisbon 2012 July 10-13 Abstract Book. Lisbon, 2012. P. 194.
7. Kozin V.V., Kostyuchenko R.P. Mesoderm formation in the polychaete *Nereis virens* // International conference “Modern Microscopy Techniques in Biology and Medicine”. Saint-Petersburg, 2009. P. 15.